

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



# **Diagnosis of Inflammatory Rheumatic Diseases: Preliminary Approach by Metabolomics**

Sara Martins Teixeira

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Versão Pública

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes  
Professora Doutora Maria Teresa Rebelo

2019



*Reserve your right to think, for even to think  
wrongly is better than not to think at all.*

**Hypatia**

## Agradecimentos

★

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a contribuição e apoio de muitos. Assim, gostaria de deixar aqui os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Alexandra Antunes, por me ter recebido no seu grupo de investigação no Centro de Química Estrutural, no Instituto Superior Técnico, pela partilha de conhecimentos e apoio.

À Doutora Judit Morello, pela orientação no mundo da metabolómica, motivação e por toda a paciência.

À Professora Doutora Sofia de Azeredo Pereira, pela receção no grupo de Farmacologia, no Centro de Estudos de Doenças Crónicas, simpatia e disponibilidade.

À Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, por ter aceite ser minha orientadora e pela atenção demonstrada.

À equipa de investigação clínica no Hospital Egas Moniz e à Clarify Analytical, por juntos termos cumprido o objetivo da recolha das amostras biológicas para este projeto.

À minha colega de laboratório, Cláudia, por toda a ajuda, tanto a nível académico como pessoal.

Aos meus pais, Paulo e Mafalda, e avós, Joaquim, Conceição e Glória, por me terem proporcionado uma educação privilegiada e por me incentivarem a ser melhor.

Aos meus irmãos, Rita, Inês e Zé, por me terem aturado e acreditarem sempre em mim.

Às minhas amigas, Gabriela, Mariana, Sofia, Andreia, Catarina e Inês, por ouvirem os meus desabafos e por todo o carinho e força.

Aos meus colegas de mestrado em Biologia Humana e Ambiente, em especial à Bárbara, Beatriz, Maria e Mariana, pela amizade e espírito de entreajuda.

E a todos os outros que de alguma forma me apoiaram ao longo desta desafiante etapa, *obrigada*.

★

Agradeço também ao Roteiro Português de Infraestruturas de Pesquisa Científica de Interesse Estratégico (categoria 1- ref. ROTEIRO/0028/2013) pelo acesso ao nó IST da RENEM (RNEM-LISBOA-01-0145-FEDER-022125). Este trabalho foi apoiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através dos projetos UID/QUI/00100/2019 (para o Centro de Química Estrutural) e UID/MULTI/04046/2019.

## Resumo

As doenças reumáticas inflamatórias (IRDs), como a espondilite anquilosante (AS), a artrite reumatoide (RA) e o lúpus eritematoso sistémico (SLE), são caracterizadas por dor, incapacidade, comorbidade e risco de morte precoce. Cerca de 5% da população sofre de uma doença reumática inflamatória. O diagnóstico precoce e o tratamento especializado são cruciais para minimizar o impacto destas doenças nos pacientes. Embora vários avanços tenham sido feitos, o diagnóstico destas patologias ainda é um desafio hoje em dia.

Tendo em conta que a metabolómica é a tecnologia pós-genómica que oferece a caracterização mais próxima do fenótipo, esta metodologia pode constituir uma ferramenta fundamental para discriminar doentes com IRDs. De facto, a análise do metaboloma (metabolómica) está a começar a fornecer novos e eficazes biomarcadores. Assim, com o objetivo final de desenvolver uma abordagem clínica viável para o diagnóstico/ discriminação de doentes com AS, RA e SLE, este estudo tem como objetivo identificar diferenças no perfil metabólico na urina de doentes com estas três IRDs e controlos saudáveis. Para isso, foi efetuado um estudo transversal de metabolómica não-direcionada, baseado em espectrometria de massa, onde foram analisadas amostras de urina de 111 indivíduos compostos por: AS ( $n = 27$ , de acordo com os critérios da ASAS), RA ( $n = 22$ , de acordo com os critérios do ACR/ EULAR para RA) e SLE ( $n = 23$ , de acordo com os critérios de classificação do ACR para SLE) e controlos saudáveis (HC;  $n = 39$ ). As amostras de urina foram analisadas por espectrometria de massa de cromatografia líquida de alta resolução (LC-HRMS) e, de seguida, os dados foram pré-processados com o software MZmine. A matriz resultante foi normalizada por área total e analisada por análise multivariada com o software SIMCA. A identificação dos metabolitos baseou-se nos resultados obtidos em experiências HRMS de “tandem”.

Neste estudo, foram identificadas diferenças metabólicas entre controlos saudáveis e doentes com SLE e RA e foi possível discriminar doentes com SLE e RA de doentes com AS. Além disso, foram identificados três metabolitos com funções bioquímicas relevantes. Em conclusão, os resultados obtidos no âmbito deste trabalho sugerem que o perfil metabólico da urina pode ser útil para discriminar IRDs. No entanto, são necessários mais estudos para validar o potencial uso da análise metabolómica de urina para o diagnóstico/ prognóstico destas doenças na prática clínica.

### Palavras-chave:

Doenças reumáticas inflamatórias; Diagnóstico; Metabolómica; Biomarcadores; Análise multivariada; Espectrometria de massa de alta resolução.

## Abstract

Inflammatory rheumatic diseases (IRDs), such as ankylosing spondylitis (AS), rheumatoid arthritis (RA), and systemic lupus erythematosus (SLE), are characterized by pain, disability, comorbidity and risk of early death. Although many advances have been made, the diagnosis of these disorders is still very challenging.

Taking into consideration that metabolomics is a post-genomics technology that offers the closest characterization of the phenotype, this methodology can constitute a key tool for discriminating patients with IRDs. In fact, the analysis of the metabolome (metabolomics) is starting to provide new and powerful biomarkers. With the ultimate goal of developing a feasible clinical approach for AS, RA and SLE diagnosis/ prognosis, this work was aimed at identifying differences in the urinary metabolic profile, of patients diagnosed with these three IRDs and healthy controls. A cross-sectional non-targeted mass spectrometry-based metabolomics study was performed in 111 individuals composed by: AS ( $n = 27$ , according to ASAS criteria), RA ( $n = 22$ , according to ACR/ EULAR criteria for RA) and SLE ( $n = 23$ , according to ACR classification criteria for SLE) patients and healthy controls (HC;  $n = 39$ ). Urine samples were analyzed by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and data was subsequently preprocessed with the open-source software MZmine. The resulting matrix was normalized by total area and analyzed by multivariate analysis with the SIMCA software. Identification of metabolites responsible for metabolic differences between groups was based on tandem-HRMS experiments.

Using this approach, it was possible to identify metabolic differences between healthy controls and SLE and RA diseases, and to discriminate SLE and RA patients from AS patients. Additionally, three metabolites with relevant biochemical roles were identified. These results suggest that urine metabolomics can be a valuable technology to discriminate IRDs. Nonetheless, further studies are necessary to validate the potential use of urine metabolomics for the prognosis and/ or stratification of IRDs in clinical practice.

### Keywords:

Inflammatory rheumatic diseases; Diagnosis; Metabolomics; Biomarkers; Multivariate analysis; High resolution mass spectrometry.